

ANTIALLERGIC AGENT AND FERMENTED FOOD CONTAINING BIFIDUS BACTERIUM AS ACTIVE COMPONENT

Publication number: JP10309178

Publication date: 1998-11-24

Inventor: AIBA TAKESHI; SUZUKI NOBUYUKI; KOKUBO NAOMI;
HIRATA HARUHISA; SAITO YOSHIKI; KOGA
YASUHIRO

Applicant: WAKAMOTO PHARMA CO LTD

Classification:

- International: A23L1/30; A61K35/74; A61P37/08; C12N1/20;
C12R1/01; A23L1/30; A61K35/66; A61P37/00;
C12N1/20; (IPC1-7): A23L1/30; A61K35/74; C12N1/20;
C12N1/20; C12R1/01

- European:

Application number: JP19970134482 19970509

Priority number(s): JP19970134482 19970509

Report a data error here

Abstract of JP10309178

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain an antiallergic agent and a fermented food having excellent safety and effective for inducing peroral immune tolerance to intestinal normal bacterial flora and preventing the occurrence of food allergy by using a bifidus bacterial strain capable of curing food allergy as an active component. SOLUTION: This agent contains a human-originated bifidus bacterial strain capable of curing food allergy and belonging to Bifidobacterium infantis, Bifidobacterium breve, Bifidobacterium longum or Bifidobacterium bifidum as an active component. The bifidus bacterial strain is preferably Bifidobacterium infantis JCM 1222 and/or Bifidobacterium breve JCM 1192 and the daily administration rate of the bifidus bacteria for adult is $\geq 1 \times 10^6$, preferably 1×10^8 to 1×10^{10} in terms of the number of living cells.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-309178

(43) 公開日 平成10年(1998)11月24日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

A 2 3 L 1/30

A 2 3 L 1/30

Z

A 6 1 K 35/74

A B F

A 6 1 K 35/74

A B F A

C 1 2 N 1/20

C 1 2 N 1/20

A

// (C 1 2 N 1/20

C 1 2 R 1:01)

審査請求 未請求 請求項の数 3 F D (全 5 頁)

(21) 出願番号

特願平9-134482

(22) 出願日

平成9年(1997)5月9日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成8年12月20日
日本無菌生物ノートバイオロジー学会発行の「第30回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会 日程と抄録」に発表

(71) 出願人 000100492

わかもと製薬株式会社

東京都中央区日本橋室町1丁目5番3号

(72) 発明者 相場 勇志

東京都中央区日本橋室町1丁目5番3号

わかもと製薬株式会社内

(72) 発明者 鈴木 信之

東京都中央区日本橋室町1丁目5番3号

わかもと製薬株式会社内

(72) 発明者 小久保 直美

東京都中央区日本橋室町1丁目5番3号

わかもと製薬株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ビフィズス菌を有効成分とする抗アレルギー剤および醗酵食品

(57) 【要約】

【目的】 本発明は経口免疫寛容を誘導することにより食物アレルギーの発症を防止または治療できる乳酸菌製剤および醗酵食品を提供する。

【構成】 食物アレルギーを治療する能力を有するヒト由来のビフィズス菌、ビフィドバクテリウム・インファンティス (*Bifidobacterium infantis*)、ビフィドバクテリウム・ブレーベ (*Bifidobacterium breve*)、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*) を有効成分とする抗アレルギー剤および醗酵食品。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 食物アレルギーを治療する能力を有するビフィズス菌を有効成分とする抗アレルギー剤および醗酵食品。

【請求項2】 ビフィズス菌がヒト由来であり、ビフィドバクテリウム・インファンティス (*Bifidobacterium infantis*)、ビフィドバクテリウム・ブレーベ (*Bifidobacterium breve*)、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*) に属する菌株である請求項1記載の抗アレルギー剤および醗酵食品。

【請求項3】 ビフィズス菌がビフィドバクテリウム・インファンティス JCM 1222 およびビフィドバクテリウム・ブレーベ JCM 1192 の両菌株またはいずれか一方の菌株である請求項1記載の抗アレルギー剤および醗酵食品。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は食物アレルギーを治療する能力を有するビフィズス菌を有効成分とする抗アレルギー剤および醗酵食品に関する。

【0002】

【従来の技術】 食物アレルギー罹患者の数は世界的に増加の傾向にあり特に先進国においてその増加は著しい。従来、食物アレルギーの予防・治療には原因食物の除去や抗アレルギー剤の投与が行われてきた。しかし、原因食物の除去には、患者の肉体的・精神的発育の阻害、食物の選択にともなう家族の負担や集団生活の制限等多くの問題がある。また、抗アレルギー剤の長期使用にも副作用の問題がある。さらに現在までの知見からは食物とアレルギーの関係を理論的に説明するには困難な点が数多く、画一的な治療法を立てるのが現状である。

【0003】 ところで先進国における近年の食物アレルギー患者数の増加に対する説明の中で有力なものの一つとして、ヒトが種々の病原微生物に感染する機会が減少したためであるとする説がある。わが国でもこの数十年の間に住宅衛生環境が改善され、予防接種が徹底され、そして各人の栄養状態が良好となったため、感染症による周産期死亡が激減し、幼児期、学童期においても感染症にほとんど罹患しなくなっている。このように微生物による強力な侵襲を受けなくなり、いわば我々が無菌動物化してきたため、無菌動物のように抗原刺激に対して過剰に反応する、すなわちアレルギー症状を呈するようになってきたというものである。

【0004】 無菌動物は帝王切開により母体より無菌的に取り出した胎児をアイソレーターの中で滅菌飼料を与えて育て継代したもので文字通り体内には全く微生物を持たない。無菌動物の生体防御機構の特徴の一つとして

食物抗原の侵入に対して過剰に応答を示すことが知られている。Wannemuehlerらは、グラム陰性桿菌の細胞壁の構成成分であるリポ多糖を投与することにより無菌マウスに容易に経口免疫寛容（生体にとって最も大量の抗原刺激である食物抗原に対する過剰な免疫応答を防ぐための調節機構）を誘導できることを報告し、グラム陰性桿菌を含む腸内常在菌叢が、通常は消化管免疫系の経口抗原に対する免疫寛容の維持に関与していることを示している (J. Immunol., 129:959, 1982)。また人工栄養の乳児は母乳栄養の乳児に比べ、アレルギー疾患の罹患率および高IgE血症の発症率が有意に高いという報告がある (Juto et al., J. Allergy Clin. Immunol., 66:402-407, 1980; Rowntree et al., Archives of Disease in Childhood, 60:727-735, 1985) が、弁野ら（乳児栄養と腸内フローラ、光岡知足編 腸内フローラと栄養pp13-33, 学会出版センター, 1983）は糞便菌叢を調べた結果、人工栄養児では母乳栄養児に比べビフィズス菌の菌数が有意に低く、逆にクロストリジウム、シュールドモナスの菌数および検出率が高いことを報告している。以上のように腸内常在菌叢と経口免疫寛容維持能の間には密接な関係があり、食物アレルギーはこの経口免疫寛容が何らかの原因で破綻した代表的な例と予測される。このような現状に鑑み、経口免疫寛容の誘導維持能の高い菌種を腸内常在菌叢の優勢菌種にして食物アレルギーを予防・治療する薬剤の創製が望まれている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は腸内常在菌叢に経口免疫寛容を誘導することにより、食物アレルギーの発症を防ぎ、治療するのに有効かつ安全な抗アレルギー剤もしくはそれらの効力が発揮できる醗酵食品を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは通常マウスと無菌マウスの経口免疫寛容誘導試験の比較から腸内常在菌叢が経口免疫寛容誘導を維持していることを確認した。そこで誘導維持能の良好な菌種を見出し、優勢に保てれば食物アレルギーの予防・治療に有用であると考え、研究を進めた結果、母乳栄養児の最優勢菌種であるビフィズス菌が良好な誘導維持能を持つことを見出し、本発明を完成するにいたった。すなわち、本発明は、ビフィズス菌を有効成分とする医薬品または醗酵食品を用いて、経口免疫寛容を誘導維持することにより食物アレルギーの治療あるいは予防に極めて有用な手段を提供するものである。

【0007】 本発明に用いるビフィズス菌としてはヒト由来のビフィズス菌、ビフィドバクテリウム・インファンティス (*Bifidobacterium infantis*)、ビフィドバクテリウム・ブレーベ (*Bifidobacterium breve*)、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium*

longum)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム(Bifidobacterium bifidum)などが挙げられるが、特に乳児の腸内に多く見られるビフィドバクテリウム・インファンティス、ビフィドバクテリウム・ブレーベが例示される。具体的にはビフィドバクテリウム・インファンティスJCM 1222、ビフィドバクテリウム・ブレーベJCM 1192などが好適である。これらの菌株は例えば理化学研究所微生物系統保存施設に保存されており、分譲を受けることにより容易に入手可能な菌株である。

【0008】本発明のビフィズス菌の菌体を取得するための培養方法および菌体分離方法には特に制限はなく、通常の方法でよい。また菌体としては純粋に分離した菌体のほか、菌体含有物(培養物、懸濁物、ヨーグルト等菌体を含有した醗酵食品)を含む。本菌体の乾燥方法としては凍結乾燥が好適である。

【0009】本発明の有用ビフィズス菌を医薬品として投与する場合、本有用ビフィズス菌を純粋培養し遠心分離などの方法により集菌後、適切な安定剤を加え凍結乾燥して得られる凍乾菌体を有効成分として単剤で投与することも可能であり、また、局外規ビフィズス菌、局外規ラクトミン、局外規耐性乳酸菌などの他の整腸生菌成分と同時に投与しても良い。これらの製剤は常法に従って種々の形態で投与される。その投与形態としては例えば散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、シロップ剤などの形態が好ましく経口的に安全に投与することができる。これらの各種製剤は常法に従って、主薬に賦形剤、結合剤、崩壊剤、コーティング剤、潤滑剤、安定剤、矯味矯臭剤、溶解補助剤、懸濁剤、希釈剤などの医薬の製剤技術分野において通常使用しうる既知の補助剤を用いて製剤化することができる。投与量においては対象疾患、疾病の程度によって異なるが、例えば成人に対して生菌数で1日 1×10^6 個以上、好ましくは $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$ 個を症状に応じて1日1回または数回に分けて投与することができる。また、本有用ビフィズス菌はヨーグルトなどの醗酵食品としての形態あるいはヨーグルト味などの錠薬としても投与が可能である。例えば牛乳や羊乳などにヨーグルト製造上のスターター菌であるラクトバシラス・ブルガリカス、ラクトバシラス・アシドフィルス、ラクトバシラス・ヘルベチカス、ストレプトコッカス・サーモフィルス、ストレプトコッカス・ラクチスなどの酪農乳酸菌と本発明の有用ビフィズス菌を接種し混合培養あるいは各々単独培養後に混ぜ合わせることで醗酵乳やヨーグルトを製造することができる。また、本発明の有用ビフィズス菌の凍乾菌体を用いて通常の製薬方法に従ってヨーグルト味などの錠薬を製造することができる。次に実施例をもって詳細に本発明を説明するが、これによって本発明が限定されるものではない。

【0010】

【実施例】

〔試験例1〕 無菌マウスとSPFマウスの経口免疫寛容誘導試験

1) 試験方法

無菌マウス(BALB/c雄)はTrexler型プラスチックアイソレーターを用い滅菌した飼料および水を与えて飼育した。SPFマウス(BALB/c雄)は常法に従って飼育した。経口免疫寛容誘導は5週令時(1週とする)より1日1回4日間連続卵白アルブミン(OVA、生化学工業)を経口投与(5mg/day)し、その後0週(6週令時)よりOVA1mgとAlum(Pierce)0.1mgを腹腔内に投与、以後2週目毎にこの腹腔内投与を行った。0週、3週、5週、7週、9週にマウスより血清を採取し各種抗体価を測定した。総免疫グロブリンE(IgE)、OVA特異的免疫グロブリンG1(IgG1)の測定は酵素免疫測定法(ELISA)を用いて常法に従って行った。OVA特異的抗体価の定量では、OVA1mg+Alum0.1mgをSPFマウスに0、2週に腹腔免疫し3週目に採血した血清(数匹分をプールしたもの)を標準血清(100unit/ml)として用いた。

【0011】結果を図1に示す。OVA抗原の腹腔内投与後9週目までの観察期間中、経口免疫寛容誘導を加えたSPFマウスでは、総IgE値はいずれも検出限界値程度であり、経口免疫寛容が成立することが確認された。ところが、無菌マウスでは、総IgE値は経口免疫寛容誘導にもかかわらず有意な高値を維持していた。すなわち無菌マウスでは経口免疫寛容誘導に対して抵抗性になっていることが示された。

【0012】〔試験例2〕 ビフィドバクテリウム・インファンティスJCM 1222株およびビフィドバクテリウム・ブレーベJCM 1192株による無菌マウスにおける経口免疫寛容誘導試験

1) 細菌の培養と試験菌液の調製方法

ビフィドバクテリウム・インファンティス(JCM 1222)、ビフィドバクテリウム・ブレーベ(JCM 1192)、クロストリジウム・パーフリンジェンス(Clostridium perfringens JCM 1290)は理化学研究所より購入した。各菌株の継代培養はGAM培地を用いて N_2 80%、 H_2 10%、 CO_2 10%条件下でいずれも37℃で行った。各菌株はGAM broth 10mlを用いて37℃、3日間嫌気培養した。培養終了後、遠心分離(3,000rpm、15分)により菌体を集め10mlに再懸濁したもの(約 2×10^9 /ml)を試験菌液として用いた。これらの菌液はまず無菌のBALB/c雌マウスに経口接種し、それから生まれた子を菌定着マウスとして実験に用いた(各5匹)。また対照として無菌およびSPFマウスも実験に用いた(各5匹)。

【0013】2) 試験方法

無菌マウスおよび菌定着マウスはTrexler型プラスチックアイソレーターを用い、滅菌した飼料および水を与えて飼育した。経口免疫寛容誘導試験および抗体価測定は試験例1に記載したと同様の方法で行った。結果を図2に示す。ビフィドバクテリウム・インファンティス定着マウスでは、総IgE、OVA特異的IgG1の両方が有意な低値となり経口免疫寛容再誘導が成立した。また、ビフィドバクテリウム・ブレーベでは、特に総IgEが低値となり軽度ではあるが、経口免疫寛容再誘導が成立した。一方、クロストリジウム・パーフリンジェンスでは再誘導が成立しなかった。

【0014】〔実施例1〕 ビフィドバクテリウム・インファンティスJCM 1222またはビフィドバクテリウム・ブレーベJCM 1192の乾燥菌末の調製
ビフィドバクテリウム・インファンティスJCM 1222およびビフィドバクテリウム・ブレーベJCM 1192を各々0.3%の炭酸カルシウムを含むブリックス・リバー液体培地に接種後、37℃、18~24時間静置培養を行なった。培養終了後、7,000rpm、15分間遠心分離を行い培養液の1/100量の濃縮菌体を得た。

【0015】次いで、各々の濃縮菌体にグルタミン酸ソーダ5%（重量）、可溶性澱粉5%（重量）、ショ糖5%（重量）および硫酸マグネシウム7水和物1%（重量）を含む分散媒と同量混合し、pH7.0に修正後、-40℃以下で凍結してから凍結乾燥を行った。得られた各々の凍結乾燥菌末を60メッシュのフルイで粉末化して両菌株の乾燥菌末を調製した。

【0016】〔実施例2〕 スターター菌ラクトバシラス・アシドフィルスとビフィドバクテリウム・インファンティスJCM 1222またはビフィドバクテリウム・ブレーベJCM 1192の混合培養による醗酵乳の製造

醗酵乳のスターター菌であるラクトバシラス・アシドフィルスを脱脂粉乳11.5%、酵母エキス0.5%、アスコルビン酸0.03%を含む還元脱脂乳培地に接種し、37℃、16時間培養したものをバルクスターターとした。一方、生乳および脱脂粉乳からなる原料ミックスに実施例1で調製したビフィドバクテリウム・インフ

ァンティスJCM 1222またはビフィドバクテリウム・ブレーベJCM 1192の培養液と先に調製したバルクスターター（ラクトバシラス・アシドフィルスの培養液）をそれぞれ5%ずつ接種し、38℃、16時間培養を行い、各々2種類の醗酵乳を得た。本発明の菌株を用いて製造した醗酵乳は風味が良好、かつ美味であり嗜好性の高い製品であった。

【0017】〔実施例3〕 ビフィドバクテリウム・インファンティスJCM 1222またはビフィドバクテリウム・ブレーベJCM 1192の配合錠剤の製造
第12改正日本薬局方解説書製剤総則「錠剤」の規定に準拠し、実施例1で調製したビフィドバクテリウム・インファンティスJCM 1222乾燥菌末2mg（菌数、 5×10^8 相当）またはビフィドバクテリウム・ブレーベJCM 1192乾燥菌末2mg（菌数、 6.5×10^8 相当）と乳糖（日局）61mg、澱粉（日局）116.2mg、結合剤としてポリビニルピロリドンK25（日局）20mg、滑沢剤としてステアリン酸マグネシウム（日局）0.8mgを加えて均一に混合し、打錠機で圧縮成型し1錠当たり200mgの素錠（2種類）を作り、さらに、ヒドロキシプロピルセルロースを用いてフィルムコーティングを施して白色のフィルムコーティングされた錠剤（2種類）を製造した。

【0018】

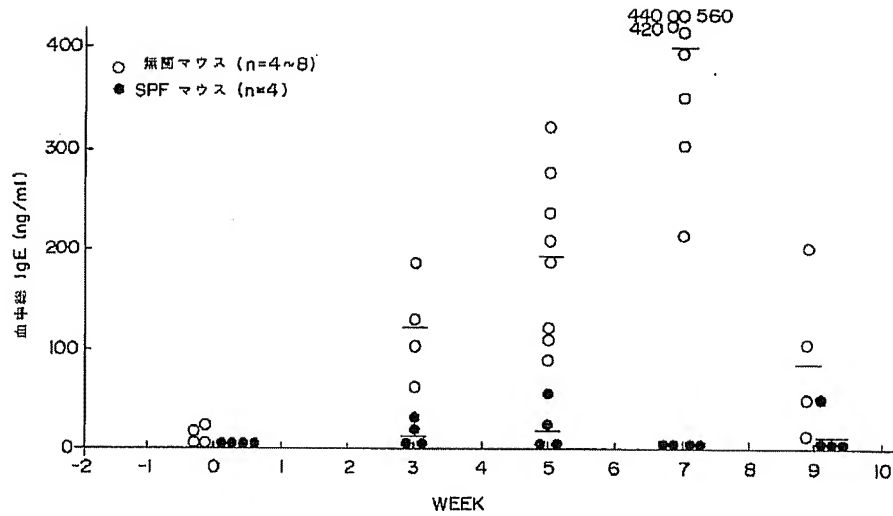
【発明の効果】本発明は経口免疫寛容誘導維持能の高いヒト由来のビフィズス菌、特にビフィドバクテリウム・インファンティスまたはビフィドバクテリウム・ブレーベを有効成分とする抗アレルギー剤および醗酵食品を提供するものである。本発明のビフィズス菌製剤あるいは本ビフィズス菌を含んだ醗酵食品を用いて、食物アレルギーの予防や治療が可能となる。

【図面の簡単な説明】

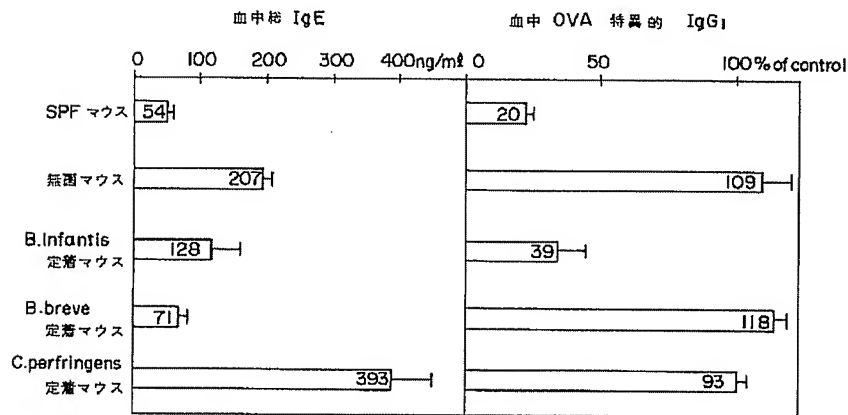
【図1】卵白アルブミンに対する経口免疫寛容誘導後の血中総IgE値の変化（SPFマウスと無菌マウスの比較）

【図2】ビフィズス菌を定着した無菌マウスに経口免疫寛容を誘導して9週間後の血中総IgE値と卵白アルブミン特異的IgG1値

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 平田 晴久
東京都中央区日本橋室町1丁目5番3号
わかもと製薬株式会社内

(72)発明者 斎藤 嘉章
東京都中央区日本橋室町1丁目5番3号
わかもと製薬株式会社内
(72)発明者 古賀 泰裕
神奈川県伊勢原市上粕屋246東海大学伊勢
原職員住宅307